

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 avril 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/29055 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: C07H 3/06,
C08B 37/00, A61K 31/702, A61P 19/00, 25/00

(74) Mandataire: MORVAN, Michèle; Aventis Pharma S.A.,
Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165
Antony Cedex (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02897

(22) Date de dépôt international:

18 octobre 2000 (18.10.2000)

(25) Langue de dépôt:

français

(26) Langue de publication:

français

(30) Données relatives à la priorité:

99/13182 22 octobre 1999 (22.10.1999) FR

(71) Déposant: AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20 Av-
enue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs: MOURIER, Pierre; 1, rue Etienne Mehul,
F-94220 Charenton le Pont (FR). PERRIN, Elisabeth;
23, rue Portevin, F-27000 Evreux (FR). VISKOV,
Christian; 3, rue du Béarn, F-91130 Ris Orangis (FR).
STUTZMANN, Jean-Marie; 9, rue de l'Arche, F-94440
Villecresnes (FR). WAHL, Florence; Chez M. Karoby, 5,
rue de l'Ave Maria, F-75004 Paris (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

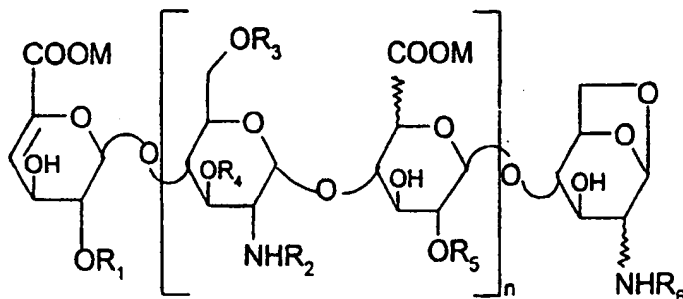
Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL OLIGOSACCHARIDES, PREPARATION METHOD AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CON-
TAINING SAME

(54) Titre: NOUVEAUX OLIGOSACCHARIDES, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES
LES CONTENANT



(I)

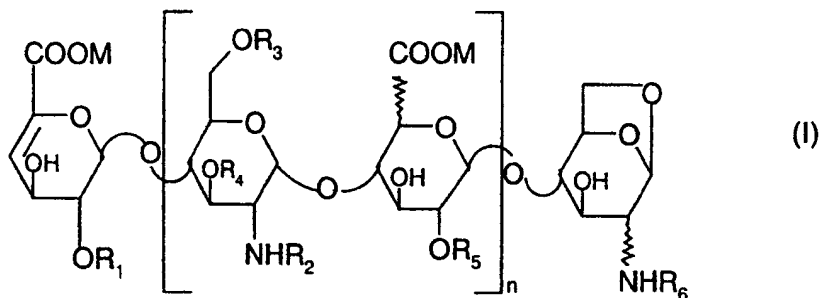
(57) Abstract: The invention concerns oligosaccharides of formula (I), their mixtures, their diastereomers, methods for preparing them and pharmaceutical compositions containing them.

(57) Abrégé: La présente invention concerne des oligosaccharides de formule (I), leurs mélanges, leurs diastéréoisomères, leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

WO 01/29055 A2

NOUVEAUX OLIGOSACCHARIDES, LEUR PREPARATION ET LES
COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT

La présente invention concerne des oligosaccharides de formule :



- 5 leurs mélanges, leurs diastéréoisomères, leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

Des disaccharides sulfatés possédant en extrémité réductrice une structure 1,6-anhydro ont été décrits par H.P. WESSEL, J. Carbohydrate Chemistry, 11(8), 1039-1052 (1992); aucune activité pharmacologique n'est mentionnée pour ceux-ci.

- 10 Des trisaccharides sulfatés comportant un motif 1,6-anhydro ont également été décrits dans le brevet EP84999 et par Y. ICHIKAWA et coll., Carbohydr. Res, 141, 273-282 (1985) comme intermédiaires pour la préparation d'oligosaccharides supérieurs. Ces trisaccharides ont une faible activité anti-Xa.

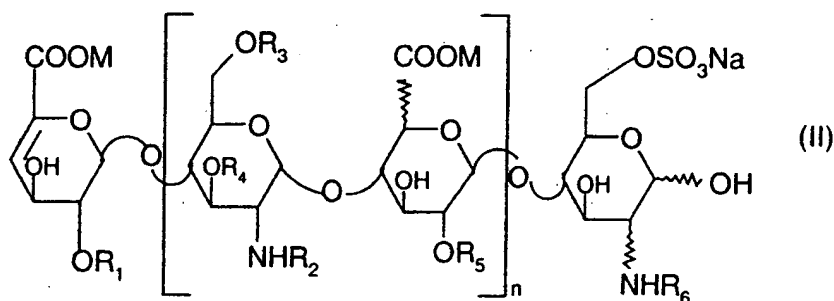
- Dans la formule (I) n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄ et R₅, identiques ou différents, 15 représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₆, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium.

Ces oligosaccharides comportent ainsi un nombre pair de saccharides.

Dans la formule (I), R₄ est, de préférence, un atome d'hydrogène.

De façon préférentielle, n est un entier de 0 à 10 et, en particulier de 0 à 6 et encore plus particulièrement de 1 à 6.

Les oligosaccharides de formule (I) peuvent être préparés par action d'un hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire sur des oligosaccharides de formule :



5

dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R_1 , R_3 , R_4 et R_5 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M , R_2 et R_6 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M ou COCH_3 et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium, ou un mélange de ceux-ci.

- 10 Cette réaction s'effectue en milieu aqueux, à une température de 40 à 80°C, à un pH de 10 à 13.

Comme hydroxyde de métal alcalin qui peut être utilisé, on peut citer la soude, la potasse, l'hydroxyde de lithium et l'hydroxyde de césium.

- 15 Comme hydroxyde d'ammonium quaternaire qui peut être utilisé, on peut citer l'hydroxyde de tétrabutylammonium.

La quantité d'hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire doit être suffisante pour que le pH du milieu réactionnel reste stable durant toute la durée de la réaction. Il est ainsi nécessaire d'ajouter en continu tout au long de la réaction l'hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire.

De préférence, l'hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire est sous forme de solution aqueuse de 1 à 5%.

De façon préférentielle, la réaction s'effectue à une température de 60 à 70°C.

Avantageusement, le pH réactionnel est de 11 à 12,5.

- 5 La réaction est arrêtée par acidification du milieu réactionnel, par exemple par addition de résine acide telle que la résine Amberlite IR120^R (Fluka).

- Les oligosaccharides de formule (I) peuvent être éventuellement purifiés par chromatographie par perméation de gel de type polyacrylamide-agarose tel que celui commercialisé sous la marque Ultrogel ACA202^R (Biosepra) selon le protocole décrit
- 10 ci-dessous pour la séparation des oligosaccharides intermédiaires de formule (II). Les oligosaccharides de formule (I) pour lesquels n est 0 ou 1 peuvent aussi éventuellement être purifiés sur colonne d'alumine avec comme éluant un mélange eau-éthanol.

- Les oligosaccharides intermédiaires de formule (II) et leurs mélanges peuvent être
- 15 obtenus par séparation par chromatographie sur gel d'un mélange d'oligosaccharides (III) obtenu par dépolymérisation enzymatique de l'héparine ou dépolymérisation basique de l'ester benzylique de l'héparine ou d'un ester benzylique d'héparine d'hémisynthèse.

- Cette chromatographie s'effectue sur des colonnes remplies de gel de type
- 20 polyacrylamide-agarose tel que celui commercialisé sous la marque Ultrogel ACA202^R (Biosepra). De préférence, on utilise une batterie de colonnes de gel polyacrylamide agarose. Le nombre de colonnes utilisées est adapté en fonction du volume, du gel et des oligosaccharides à séparer. Le mélange est élué par une solution contenant un tampon phosphate et du chlorure de sodium. De préférence, la solution
- 25 tampon phosphate est une solution à 0,02 mol/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7) contenant 0,1 mol/l de chlorure de sodium. La détection des différentes fractions est réalisée par spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les fractions ainsi obtenues

peuvent ensuite être éventuellement purifiées par exemple par chromatographie SAX (strong anion exchange) selon les méthodes connues de l'homme du métier et notamment selon les méthodes décrites par K.G. Rice et R.J Linhardt, Carbohydrate Research 190, 219-233 (1989), A. Larnikjaer, S.H. Hansen et P.B. Ostergaard, Carbohydrate Research, 266, 37-52 (1995) et dans le brevet WO90/01501 (exemple 2). Les fractions sont ensuite lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel telle qu'une colonne de gel Séphadex G10^R (Pharmacia Biochemicals).

Lorsque la purification n'est pas réalisée par chromatographie SAX, les lyophilisats peuvent être éventuellement purifiés par précipitation simple ou fractionnée selon les méthodes connues de l'homme du métier et notamment selon la méthode décrite dans le brevet FR2548672. De façon générale, on opère selon le protocole suivant :

La fraction lyophilisée à purifier est dissoute à 25°C dans environ dix volumes d'eau distillée. Par ajout de méthanol ou d'éthanol, on fait précipiter l'oligosaccharide désiré en contrôlant son enrichissement par chromatographie CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance). L'ajout de méthanol ou d'éthanol est déterminé en fonction de la pureté et du rendement désiré du dit oligosaccharide. De même, cette opération peut être réalisée en plusieurs étapes successives à partir de la solution initiale de lyophilisat. Pour cela, on rajoute l'agent insolubilisant (méthanol ou éthanol) par petites portions et on isole après chaque ajout le précipité obtenu. Les précipités ainsi préparés sont analysés par chromatographie CLHP. Selon la pureté et le rendement désiré, on rassemble les fractions adéquates de précipité.

Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0, 1$ ou 2 , il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation enzymatique.

Cette dépolymérisation s'effectue au moyen d'héparinase I (EC 4.2.2.7), au sein d'une solution tampon phosphate de pH7, en présence de chlorure de sodium et de BSA (Albumine de Sérum Bovin), à une température comprise entre 10 et 18°C et, de préférence 15°C, pendant 8 à 10 jours et, de préférence, 9 jours. La dépolymérisation est arrêtée par exemple par chauffage du milieu réactionnel à 100°C pendant 2

minutes et le mélange est récupéré par lyophilisation. Il est préférable d'utiliser 7UI d'héparinase I pour 25 g d'héparine. La solution tampon phosphate comprend généralement 0,05 mol/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7) en présence de 0,1 mol/l de chlorure de sodium. La concentration en BSA est généralement de 2%.

- 5 Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0, 1, 2, 3$ ou 4, il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation d'un ester benzylique de l'héparine.

L'ester benzylique de l'héparine peut être préparé selon les méthodes décrites dans les brevets US5389618, EP40144, FR2548672. Le taux d'estérification sera de
10 préférence compris entre 50 et 100 %. De façon préférentielle, il sera compris entre 70 et 90%.

La dépolymérisation s'effectue en milieu aqueux, au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin (hydroxyde de lithium, soude, potasse ou hydroxyde de césium par exemple) ou d'un hydroxyde d'ammonium quaternaire (hydroxyde de tétrabutylammonium par
15 exemple), de préférence, à une molarité comprise entre 0,1 et 0,2 mol/l, à une température comprise entre 40 et 80°C, pendant 5 à 120 minutes. Dans un mode préféré, on opère pendant 5 à 15 minutes, à une température comprise entre 60 et 70°C, avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,15 mol/l. La réaction de
20 dépolymérisation est arrêtée par neutralisation par addition d'un acide tel que l'acide acétique. Après addition de 10% en poids par volume d'acétate de sodium, le mélange d'oligosaccharides est précipité par addition de méthanol, de préférence, 2 volumes pour 1 volume de milieu réactionnel et filtré.

Selon un aspect préféré de l'invention, le mélange d'oligosaccharides obtenu après dépolymérisation chimique, sous forme d'une solution aqueuse, est enrichi par
25 ultrafiltration sur membranes avec un seuil de coupure nominal approprié (type Pellicon en cellulose régénérée commercialisées par Millipore); le type de membrane étant adapté en fonction du type d'oligosaccharides enrichis à récupérer. Pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 0$, on utilisera une membrane de seuil de

coupure nominal de 1 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 1$, on utilisera une membrane 1 kDa ou 3 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 2$, on utilisera une membrane 3 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 3$ ou 4, on utilisera une membrane 5 kDa. Au cours de cette opération, le perméat est
5 récupéré et le rétentat rejeté. Ainsi, la fraction de produit enrichi peut représenter de 50 à 10% du mélange d'oligosaccharides initial tout en conservant au moins 80% de l'oligosaccharide désiré.

Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0$ à 25, il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation d'un ester benzylique de
10 polysaccharide sulfaté d'hémisynthèse. L'ester benzylique de polysaccharide sulfaté d'hémisynthèse est préparé à partir de polysaccharides sulfatés d'hémisynthèse obtenus à partir du polysaccharide K5 et selon les méthodes décrites dans les brevets WO94/29352 et WO96/14425. Les conditions d'estérification, de dépolymérisation et de récupération sont les mêmes que celles décrites précédemment pour l'ester
15 benzylique d'héparine.

Dans tous les procédés précédents, l'héparine initiale peut être d'origine porcine, ovine, caprine ou bovine et peut provenir des mucus, poumons ou peaux des animaux. De préférence, on utilise une héparine de mucus porcin, ovin ou de poumons de boeuf et encore plus préférentiellement de mucus porcin.

20 Les oligosaccharides de formule (I) présentent des propriétés anti-inflammatoires et peuvent ainsi être utilisées pour la prévention ou le traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de substances cytotoxiques telle que le monoxyde d'azote (NO) dont la forme inductible est libérée notamment par les neutrophiles ou les macrophages lorsque ceux-ci migrent et sont activés au niveau
25 d'un tissu. L'activation, la migration, l'adhésion et l'infiltration des neutrophiles se produit au niveau des zones tissulaires ischémiées à la suite d'une occlusion ou d'un spasme d'une artère vascularisant ce tissu. Ces ischémies peuvent se produire soit au niveau cérébral (accident vasculaire cérébral), soit au niveau du myocarde (infarctus

du myocarde), soit au niveau des membres inférieurs (ischémies dites périphériques). Les oligosaccharides de formule (I) peuvent ainsi être utilisées pour la prévention et/ou le traitement des maladies neurodégénératives pour lesquelles l'inflammation cérébrale joue un rôle délétère pouvant conduire à la mort parmi lesquelles on peut

5 citer les ischémies cérébrales, les ischémies cardiaques (infarctus du myocarde), les ischémies périphériques, les traumatismes du système nerveux central et notamment les traumatismes crâniens, spinaux et cranio-spinaux, la sclérose en plaques, les douleurs neuropathiques et les neuropathies périphériques, les maladies du motoneurone dont la sclérose latérale amyotrophique, le neuro-sida, la maladie

10 d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la Chorée de Huntington et certaines formes d'ostéoarthrites notamment à localisation articulaire.

L'activité anti-inflammatoire de ces produits est démontrée in vivo dans le test de production de NOx (nitrite et nitrate) induite par un lipopolysaccharide (LPS) provenant d'E. Coli selon le protocole décrit par M. YAMASHITA et coll., Eur. J.

15 Pharmacol, 338, 2, 151-158 (1997) ou J.E. SHELLITO et coll. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 13, 1, 45-53 (1995).

On injecte, à des souris CD1 mâles (Charles River, 25-35g), à T0 par voie intraveineuse bolus 0,5 mg/kg de l'oligosaccharide, à T+15 minutes, par voie sous-cutanée 1 ou 2 mg/kg de l'oligosaccharide. A T+30 minutes, on administre 100 mg/kg

20 de lipopolysaccharide (LPS) provenant d'E. Coli (Sigma L3129, sérotype 0127:B8). A T+3 heures on injecte à nouveau par voie sous-cutanée 1 ou 2 mg/kg de l'oligosaccharide. A T+5 heures 30 minutes, un échantillon de sang est récupéré par ponction à l'oeil et les concentrations en NOx (nitrite et nitrate) dans le plasma sont déterminées avec la méthode colorimétrique de Griess après réduction du nitrate en

25 nitrite par nitrate réductase de la manière suivante : 12 µl de l'échantillon de plasma sont mélangés avec 88 µl d'eau déionisée et incubés dans le noir 1 heure à température ambiante avec 40 µl de tampon phosphate (0,31M, pH 7,5), 20 µl de β-NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) (0,86mM), 20 µl de FDA (flavine adénine dinucléotide) (0,11 mM) et 20 µl de nitrate réductase (2U/ml)

(Boehringer Mannheim). 10 μ l de ZnSO_4 (1M) sont ajoutés pour précipiter les protéines et après mélange, les échantillons sont centrifugés à 20 000g pendant 5 minutes. Finalement, 50 μ l du supernatant sont incubés 10 minutes à température ambiante avec 100 μ l du réactif de Griess (sulfanilamide à 1 % dans un mélange acide phosphorique/naphtyléthylènediamine 0,1% dans l'eau déionisée (V/V)). Les densités optiques sont lues à 540 nm avec un spectrophotomètre microplaques; chaque point étant déterminé 2 fois. KNO_3 et NaNO_2 sont utilisés comme standard pour la méthode colorimétrique.

Dans ce test, les oligosaccharides selon l'invention inhibent à plus de 50 % la formation de NO_x .

Parmi les oligosaccharides de formule (I) préférés, on peut notamment citer les oligosaccharides pour lesquels :

- n est égal à 0, R_1 et R_6 représentent un radical SO_3Na et M est sodium et le mélange de ses diastéréoisomères
- 15 - n est égal à 1, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_6 , représentent un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium et le mélange de ses diastéréoisomères
- n est égal à 2, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_6 représentent un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium et le mélange de ses diastéréoisomères.
- n est égal à 2, R_1 , R_2 , R_3 , R_6 , représentent un radical SO_3Na , R_5 représente un atome d'hydrogène ou un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium et le mélange de ses diastéréoisomères (dérivé 1,6 anhydro Δ Is-Is-IIs).
- 20

Les exemples suivants sont représentatifs de la préparation des oligosaccharides de formule (I) et des intermédiaires.

Dans ces exemples les significations des abréviations sont les suivantes :

Δ Is : (acide 4-déoxy-2-*O*-sulfo- α -L-thréo-hex-enopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfo- α -D-glucopyranose, sel de tétrasodium ou bien Δ UAp2S-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

Is : (acide 2-sulfo- α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfo- α -D-glucopyranose, sel de tétrasodium ou bien α -L-IdoAp2S-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

IIs : (acide α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfo- α -D-glucopyranose, sel de trisodium ou bien α -L-IdoAp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

IIIs : (acide 2-sulfo- α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino- α -D-glucopyranose, sel de trisodium ou bien α -L-IdoAp2S-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S

IdoAp : acide idopyranosyluronique

GlcNp : 2-déoxy-2-aminoglucopyranose

Δ Uap : acide 4-déoxy- α -L-thréo-hex-enopyranosyluronique

S : sulfate

15 EXEMPLES DE PREPARATION DES MELANGES DE FORMULE (II)

EXEMPLE A - préparation des oligosaccharides de formule (II) pour lesquels $n=0, 1$ et 2 par dépolymérisation enzymatique et séparation

Dissoudre 25 g d'héparine dans 250 ml d'une solution tampon phosphate contenant 0,05 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7), 0,2 mol/l de chlorure de sodium et 2 % de BSA (Albumine de Sérum Bovin). On introduit dans le mélange 7 UI d'héparinase I (EC 4.2.2.7) et la solution obtenue est refroidie à 15°C puis maintenue à cette température pendant toute la durée de la réaction de dépolymérisation. L'avancement de la réaction est suivie par des prélèvements échelonnés d'aliqots et analysés par chromatographie sur perméation de gel. Au bout de 9 jours, la réaction enzymatique

est arrêtée en chauffant le milieu réactionnel à 100°C pendant deux minutes. Le mélange refroidi est ensuite lyophilisé. On obtient ainsi un mélange d'oligosaccharides (III).

Le mélange d'oligosaccharides (III) obtenu est ensuite chromatographié selon la méthode suivante : La chromatographie s'effectue sur des colonnes remplies avec du gel polyacrylamide-agarose connu sous la dénomination Ultrogel ACA 202 et le mélange est élué par une solution contenant un tampon phosphate (0,02 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH = 7 et 0,1 mol/l de chlorure de sodium. La détection est réalisée en spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les produits peuvent être éventuellement purifiés par chromatographie SAX (strong anion exchange) ou par précipitation fractionnée selon la méthode décrite dans le brevet FR 2548672. Les fractions de produit récupéré sont lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel sephadex G10^R (Pharmacia Biochemicals).

Par cette méthode, on obtient 3 g de disaccharide Is, 1100 mg d'un mélange d'hexasaccharide contenant typiquement 55 % de dérivé $\Delta\text{Is-Is-Is}$, 35 % de $\Delta\text{Is-Is-IIs}$ et 10 % de $\Delta\text{Is-Is-IIIs}$. Ce dernier mélange peut être purifié selon les méthodes connues de l'homme du métier pour en séparer chacun des constituants ou utilisé tel quel pour la transformation en dérivés 1,6 anhydro de formule (I). Il est à noter qu'au cours de cette transformation l'hexasaccharide $\Delta\text{Is-Is-IIIs}$ ne peut conduire à la formation de composés de formule (I).

EXEMPLE B - préparation des oligosaccharides de formule (II) pour lesquels $n=0, 1, 2, 3$ ou 4 par dépolymérisation de l'ester benzylique d'héparine et séparation

a - Préparation de l'ester benzylique de l'héparine

L'ester benzylique de l'héparine est préparé selon l'exemple 3 du brevet US 5,389,618.

b- Dépolymérisation

Dissoudre 100 g d'ester benzylique de l'héparine dans 1,9 l d'eau déminéralisée. Le mélange est porté à 60°C sous agitation. Après l'obtention d'une solution homogène, on introduit en une seule fois environ 35 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 23 %. Après 10 minutes de réaction, la solution est ensuite refroidie et neutralisée par 5 80 ml d'une solution d'acide acétique environ 2 N. A cette solution, on ajoute 10 % en poids/volume d'acétate de sodium. Le mélange d'oligosaccharides est précipité par addition d'environ 2 volumes de méthanol. Le précipité est isolé par filtration, lavé au méthanol à deux reprises puis séché sous pression réduite à 50°C. Après séchage, on obtient 73,8 g d'un mélange d'oligosaccharides (II).

10 c- Enrichissement en oligosaccharide pour lequel $n = 1$

Dissoudre 30 g du mélange d'oligosaccharides obtenu précédemment dans environ 35 volumes d'eau. Cette solution est ultrafiltrée sur membrane 3 kDa (Pellicon). Lorsque 600 ml de perméat on été soutirés, on dilue le rétentat par 500 ml d'eau. L'opération est poursuivie jusqu'à soutirement de 450 ml de perméat supplémentaires. Les deux 15 fractions de perméat sont réunies puis concentrées à sec sous pression réduite. On obtient 6,1 g d'un solide blanc jaunâtre. L'analyse du solide par chromatographie de perméation sur gel indique qu'il contient environ 30 % d'oligosaccharide de formule (II) pour lequel $n=1$.

d - Fractionnement des mélanges d'oligosaccharides ultrafiltrés

20 Le mélange enrichi est fractionné sur des colonnes remplies avec du gel polyacrylamide-agarose connu sous la dénomination Ultrogel ACA 202 (on utilise 4 colonnes en série d'un diamètre de 10 cm et d'une hauteur de 50 cm). 5 g du mélange enrichi par ultrafiltration sont dissous dans 25 ml d'eau puis élués par une solution 0,2 mol/l de chlorure de sodium à la vitesse de 5 ml/min. On recueille en bas de 25 colonne des fractions de 25 ml. La détection des produits est réalisée en spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les fractions de produit pour lequel $n = 1$ sont récupérées, lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel Sephadex G10. Après lyophilisation, on obtient 1g de tétrasaccharide contenant typiquement 70 % de

dérivé Δ Is-Is de formule II ($R_1, R_2, R_3, R_5, R_6 = \text{SO}_3\text{Na}$; $R_4 = \text{H}$ et $M = \text{Na}$). Le dérivé Δ Is-Is peut être éventuellement purifié par chromatographie SAX (strong anion exchange) ou selon un aspect préférentiel par précipitation fractionnée selon la méthode décrite dans le brevet FR 2548672.

5 EXEMPLE 1

Dans un réacteur maintenu à 66°C, on introduit 5 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,0063 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 11,35). Sous agitation, on ajoute en une fois 30 mg de l'oligosaccharide de formule (II) pour lequel n est égal à 0, R_1 et R_6 représentent un radical SO_3Na et M est sodium. Le pH est alors régulé et maintenu à pH 11,35 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 10 heures, on arrête l'ajout d'hydroxyde de sodium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. Le pH de la solution est alors ramené entre 6 et 7 par addition de résine Amberlite IR120. Le mélange est filtré sur membrane Whatman GF/B puis concentré à sec sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 25°C. Le produit est repris avec 0,5 ml d'eau distillée puis lyophilisé. On obtient ainsi 29 mg d'un mélange de diastéréoisomères de l'oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 0, R_1 et R_6 représentent un radical SO_3Na et M est sodium [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronic-(1→4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino- β -D-mannopyranose, sel de trisodium) : Spectre proton dans D_2O , 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H2), 3,75 (2H, m, H6 et H3), 3,88 (1H, m, H4), 4,20 (1H, d, J=8Hz, H6), 4,22 (1H, t, J=5Hz, H3'), 4,58 (1H, m, H2'), 4,75 (1H, m, H5), 5,53 (1H, s, H1), 5,60 (1H, dd, J=6 et 1Hz, H1'), 6,03 (1H, d, J=5Hz, H4'); (acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronic-(1→4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino- β -D-glucopyranose, sel de trisodium) : Spectre proton dans D_2O , 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,34 (1H, dd, J=7 et 2Hz, H2), 3,72 (1H, t, J=8Hz, H6), 3,90 (1H, m, H3), 4,03 (1H, s, H4), 4,20 (1H, d, J=8Hz, H6), 4,23 (1H, t, J=5Hz, H3'), 4,58 (1H, m, H2'), 4,78 (1H, m, H5), 5,50 (1H, s, H1), 5,60 (1H, dd, J=6 et 1Hz, H1'), 6,03 (1H, d, J=5Hz, H4')].

EXEMPLE 2

Dans un réacteur maintenu à 62°C, on introduit 33,3 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,0063 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 11,15). Sous agitation, on ajoute en une fois 200 mg de l'oligosaccharide de formule (II) pour lequel n est égal à 1, R₁, R₂, R₃, R₅ et R₆ représentent un radical SO₃Na, R₄ représente un atome d'hydrogène et M est sodium. Le pH est alors régulé et maintenu à pH 11,15 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on arrête l'ajout d'hydroxyde de sodium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. Le pH de la solution est alors ramené entre 6 et 7 par addition de résine Amberlite IR120. Le mélange est filtré sur membrane Whatman GF/B puis concentré à sec sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 25°C. Le produit est repris avec 3 ml d'eau distillée puis lyophilisé. On obtient ainsi 230 mg de l'oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 1, R₁, R₂, R₃, R₅, R₆, représentent un radical SO₃Na, R₄ représente un atome d'hydrogène et M est sodium, sous forme d'un mélange des diastéréoisomères [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo-α-L-thréo-hex-4-enopyranosyluronic-(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo-α-L-idopyranosyluronic -(1→4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino-β-D-mannopyranose, sel d'heptasodium): Spectre proton dans D₂O, 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H₂), 3,25 (1H, m, H₂"), 3,60 (1H, m, H₃"), entre 3,70 et 4,70 (14H, massif, H₃/H₄/H₆, H₂"/H₃"/H₄"/H₅", H₄"/H₅"/H₆", H₂"/H₃"), 4,75 (1H, m, H₅), entre 5,20 et 5,40 (2H, m, H₁' et H₁"), 5,45 (1H, m, H₁"), 5,56 (1H, m, H₁), 5,94 (1H, d, J=5Hz, H₄); (acide 4-déoxy-2-O-sulfo-α-L-thréo-hex-4-enopyranosyluronic -(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopyranosyl-(1→4) acide -2-O-sulfo-α-L-idopyranosyluronic -(1→4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino-β-D-glucopyranose, sel d'heptasodium) : Spectre proton dans D₂O, 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,25 (1H, m, H₂"), 3,42 (1H, dd, J=4 et 1Hz, H₂), 3,60 (1H, m, H₃"), entre 3,70 et 4,70 (14H, massif, H₃/H₄/H₆, H₂"/H₃"/H₄"/H₅", H₄"/H₅"/H₆", H₂"/H₃"), 4,75 (1H, m, H₅), entre 5,20 et 5,40 (2H, m, H₁' et H₁"), 5,45 (1H, m, H₁"), 5,52 (1H, m, H₁), 5,94 (1H, d, J=5Hz, H₄)].

EXEMPLE 3

Dans un réacteur maintenu à 62°C, on introduit 16,7 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,0063 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 11,7). Sous agitation, on ajoute en une fois 100 mg de l'oligosaccharide de formule (II) pour lequel n est égal à 2, R₁, R₂, R₃, R₅ et R₆ représentent un radical SO₃Na, R₄ représente un atome d'hydrogène et M est sodium. Le pH est alors régulé et maintenu à pH 11,7 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 10 heures on arrête l'ajout d'hydroxyde de sodium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. Le pH de la solution est alors ramené entre 6 et 7 par addition de résine Amberlite IR120. Le mélange est filtré sur membrane Whatman GF/B puis concentré à sec sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 25°C. Le produit est repris avec 3 ml d'eau distillée puis lyophilisé. On obtient ainsi 108 mg de l'oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 2, R₁, R₂, R₃, R₅, R₆ représentent un radical SO₃Na, R₄ représente un atome d'hydrogène et M est sodium, sous forme d'un mélange des diastéréoisomères. On note de A à F les sucres constitutifs des hexasaccharides, A étant le résidu 1,6-anhydro et F le résidu acide uronique insaturé. [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo-α-L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopyranosyl-(1→4)- acide 2-O-sulfo-α-L-idopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo-α-L-idopyranosyluronique-(1→4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino-β-D-mannopyranose, sel d'undécasodium): Spectre proton dans D₂O, 600MHz, T=298K, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H2(A)), 3,25 (2H, m, H2(C+E)), 3,60 (2H, m, H3(C+E)), entre 3,65 et 4,50 (19H, massif, H2(B+D)/H3(A+B+D+F)/H4(A+B+C+D+E)/H5(C+E)/H6(A+C+E)), 4,60 (1H, s, H2(F)), 4,80 (3H, m, H5(A+B+D)), 5,18 (1H, s, H1(D)), 5,30 (1H, s, H1(B)), 5,34 (1H; d, H1(C)), 5,36 (1H, d, H1(E)), 5,46 (1H, s, H1(F)), 5,57 (1H, s, H1(A)), 5,95 (1H, d, J=5Hz, H4(F)); (acide 4-déoxy-2-O-sulfo-α-L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo-α-L-idopyranosyluronique -(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo-α-L-idopyranosyluronique-

(1→4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino-β-D-glucopyranose, sel d'undécasodium) :
 Spectre proton dans D₂O, 600MHz, T=298K, δ en ppm: 3,25 (2H, m, H2(C+E)), 3,42
 (1H, m, H2(A)), 3,60 (2H, m, H3(C+E)), entre 3,65 et 4,50 (19H, massif,
 H2(B+D)/H3(A+B+D+F)/H4(A+B+C+D+E)/H5(C+E)/H6(A+C+E)), 4,60 (1H, s,
 5 H2(F)), 4,80 (3H, m, H5(A+B+D)), 5,18 (1H, s, H1(D)), 5,31 (1H, s, H1(B)), 5,34
 (1H, d, H1(C)), 5,36 (1H, d, H1(E)), 5,46 (1H, s, H1(F)), 5,52 (1H, s, H1(A)), 5,95
 (1H, d, J=5Hz, H4(F)).

EXEMPLE 4

Dans un réacteur maintenu à 62°C, on introduit 4 ml d'une solution d'hydroxyde de
 10 sodium à 0,0316 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur
 cible (pH = 11,8). Sous agitation, on ajoute en une fois 100,8 mg un mélange
 d'oligosaccharides de formule (II) pour lequel n est égal à 2 comprenant 55 % de
 dérivé ΔIs-Is-Is (R₁, R₂, R₃, R₅ et R₆ représentent un radical SO₃Na, R₄ représente un
 atome d'hydrogène et M est sodium), 35 % de ΔIs-Is-IIs (R₁, R₂, R₃, et R₆ représentent
 15 un radical SO₃Na, R₅ représente soit un radical SO₃Na ou un atome d'hydrogène, R₄
 représente un atome d'hydrogène et M est sodium) et 10 % de ΔIs-Is-IIIs (R₁, R₂, R₃,
 R₅ et R₆ représentent un radical SO₃Na, R₄ représente un atome d'hydrogène et M est
 sodium, la fonction SO₃M du carbone C6 étant remplacée par un hydrogène). Le pH
 est alors régulé et maintenu à pH 11,8 par addition continue d'une solution
 20 d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 11 heures, on arrête l'ajout d'hydroxyde de
 sodium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. Le pH de la solution est alors
 ramené entre 6 et 7 par addition de résine Amberlite IR120. Le mélange est filtré sur
 membrane Whatman GF/B puis concentré à sec sous pression réduite (2,7 kPa), à une
 température voisine de 25°C. Le produit est repris avec 1,5 ml d'eau distillée puis
 25 lyophilisé. On obtient ainsi 110 mg d'un mélange d'oligosaccharides de formule (I)
 pour lequel n est égal à 2, contenant notamment le dérivé 1,6 anhydro ΔIs-Is-Is (R₁,
 R₂, R₃, R₅, R₆ représentent un radical SO₃Na, R₄ représente un atome d'hydrogène et
 M est sodium) et le dérivé 1,6 anhydro ΔIs-Is-IIs (R₁, R₂, R₃, R₆, représentent un
 radical SO₃Na, R₅ représente soit un radical SO₃Na ou un atome d'hydrogène, R₄

représente un atome d'hydrogène et M est sodium). L'analyse CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) en mode paire d'ions permet de suivre la transformation en dérivés de formule (I). Dans ce cas, le dosage CLHP montre que la transformation est réalisée pour les dérivés Δ Is-Is-Is, Δ Is-Is-IIs.

5 EXEMPLE 5

Dans un réacteur maintenu à 66°C, on introduit 8,6 ml d'une solution d'hydroxyde de lithium à 0,025 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 11,68). Sous agitation, on ajoute en une fois 50 mg de l'oligosaccharide de formule (II) pour lequel n est égal à 0, R₁ et R₆ représentent un radical SO₃Na et M est sodium. Le pH est alors régulé et maintenu à pH 11,68 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de lithium à 0,466 mol/l. Après 8 heures, on arrête l'ajout d'hydroxyde de lithium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. L'analyse CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) en mode paire d'ions permet de suivre la transformation en dérivé de formule (I) pour lequel n est égal à 0, R₁ et R₆ représentent un radical SO₃Na et M est sodium ou lithium. Dans ce cas, le dosage CLHP montre que la transformation est réalisée à 100%. Le rendement par étalonnage externe est de 81,2%.

EXEMPLE 6

Dans un réacteur maintenu à 66°C, on introduit 8,3 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0,0063 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 11,1). Sous agitation, on ajoute en une fois 50 mg de l'oligosaccharide de formule (II) pour lequel n est égal à 0, R₁ et R₆ représentent un radical SO₃Na et M est sodium. Le pH est alors régulé et maintenu à pH 11,1 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0,515 mol/l. Après 24 heures, on arrête l'ajout d'hydroxyde de potassium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. L'analyse CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) en mode paire d'ions permet de suivre la transformation en dérivé de formule (I) pour lequel n est égal à 0, R₁ et R₆ représentent un radical SO₃Na et M est sodium ou potassium. Dans ce cas, le dosage

CLHP montre que la transformation est réalisée à 100%. Le rendement par étalonnage externe est de 75,6 %.

EXEMPLE 7

Dans un réacteur maintenu à 66°C, on introduit 8,3 ml d'une solution d'hydroxyde de césium à 0,0063 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 10,75). Sous agitation, on ajoute en une fois 50 mg de l'oligosaccharide de formule (II) pour lequel n est égal à 0, R₁ et R₆ représentent un radical SO₃Na et M est sodium. Le pH est alors régulé et maintenu à pH 10,75 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de césium à 0,476 mol/l. Après 20 heures, on arrête l'ajout d'hydroxyde de césium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. L'analyse CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) en mode paire d'ions permet de suivre la transformation en dérivé de formule (I) pour lequel n est égal à 0, R₁ et R₆ représentent un radical SO₃Na et M est sodium ou césium. Dans ce cas, le dosage CLHP montre que la transformation est réalisée à 90,3%. Le rendement par étalonnage externe est de 73 %.

EXEMPLE 8

Dans un réacteur maintenu à 66°C, on introduit 8,3 ml d'une solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium à 0,0063 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 10,95). Sous agitation, on ajoute en une fois 50 mg de l'oligosaccharide de formule (II) pour lequel n est égal à 0, R₁ et R₆ représentent un radical SO₃Na et M est sodium. Le pH est alors régulé et maintenu à pH 10,95 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium à 0,521 mol/l. Après 16 heures, on arrête l'ajout d'hydroxyde de césium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. L'analyse CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) en mode paire d'ions permet de suivre la transformation en dérivé de formule (I) pour lequel n est égal à 0, R₁ et R₆ représentent un radical SO₃Na et M est sodium ou tétrabutylammonium. Dans ce cas, le dosage CLHP montre que la transformation est réalisée à 96,7 %. Le rendement par étalonnage externe est de 65 %.

Les médicaments selon l'invention comprennent en tant que principe actif au moins un oligosaccharide de formule (I) ou un mélange d'oligosaccharides de formule (I), sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être inerte ou physiologiquement actif. Les médicaments selon l'invention peuvent être employés par voie intraveineuse, sous-cutanée, orale, rectale, topique ou pulmonaire (inhalation).

Les compositions stériles pour administration intraveineuse ou sous-cutanée, sont généralement des solutions aqueuses. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions solides stériles qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

Comme compositions solides pour administration orale, peuvent être utilisés des comprimés, des pilules, des poudres (capsules de gélatine, cachets) ou des granulés. Dans ces compositions, le principe actif est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice, sous courant d'argon. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres que les diluants, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tels que le stéarate de magnésium ou le talc, un agent favorisant l'absorption orale, un colorant, un enrobage (dragées) ou un vernis.

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops et des élixirs pharmaceutiquement acceptables contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent comprendre des substances autres que les diluants, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales qui contiennent, outre le produit actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylèneglycols.

Les compositions pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes,
5 lotions, collyres, collutoires, gouttes nasales ou aérosols.

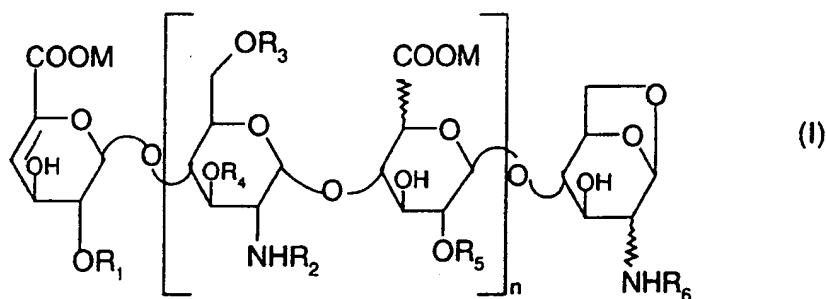
Les doses dépendent de l'effet recherché, de la durée du traitement et de la voie d'administration utilisée; elles sont généralement comprises entre 0,5 mg et 10 mg par kg par jour par voie sous-cutanée soit 3 à 60 mg par jour pour un adulte de 60 kg.

D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie appropriée en fonction de
10 l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

L'invention concerne également la méthode de prévention ou de traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de substances cytotoxiques telle que le nitrite oxyde (NO). Les oligosaccharides de formule (I) peuvent ainsi être utilisées pour la prévention et/ou le traitement des maladies
15 neurodégénératives pour lesquelles l'inflammation cérébrale joue un rôle délétère pouvant conduire à la mort parmi lesquelles on peut citer les ischémies du système nerveux central, les ischémies cérébrales, les ischémies de la rétine et de la cochlée, les ischémies cardiaques (infarctus du myocarde), les ischémies périphériques, les traumatismes du système nerveux central et notamment les traumatismes crâniens,
20 spinaux et cranio-spinaux, les traumatismes de la rétine et de la cochlée, la sclérose en plaques, les douleurs neuropathiques et les neuropathies périphériques, les maladies du motoneurone dont la sclérose latérale amyotrophique, le neuro-sida, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la Chorée de Huntington et certaines formes d'ostéoarthrites notamment à localisation articulaire.

REVENDICATIONS

1 - Oligosaccharides de formule :



dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R_1 , R_3 , R_4 et R_5 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M , R_2 et R_6 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M ou COCH_3 et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium, un mélange de ces oligosaccharides et leurs diastéréoisomères.

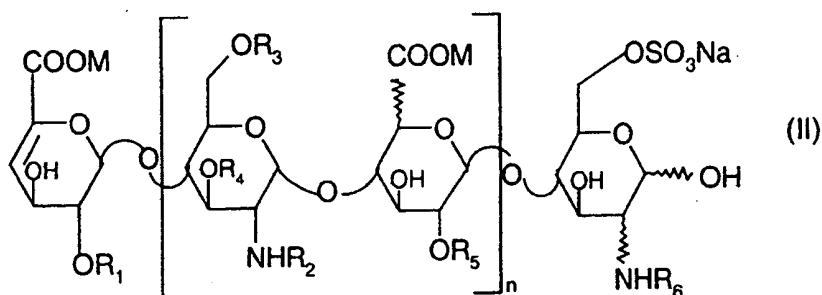
2 - Oligosaccharides de formule (I) selon la revendication 1 pour lesquels R_4 représente un atome d'hydrogène, un mélange de ces oligosaccharides et leurs diastéréoisomères.

3 - Oligosaccharides de formule (I) selon l'une des revendications 1 ou 2 pour lesquels n est un entier de 0 à 10, un mélange de ces oligosaccharides et leurs diastéréoisomères.

4 - Oligosaccharides de formule (I) selon l'une des revendications 1 ou 2 pour lesquels n est un entier de 0 à 6, un mélange de ces oligosaccharides et leurs diastéréoisomères.

5 - Oligosaccharides de formule (I) selon l'une des revendications 1 ou 2 pour lesquels n est un entier de 1 à 6, un mélange de ces oligosaccharides et leurs diastéréoisomères.

6 - Procédé de préparation des oligosaccharides de formule (I) selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on fait réagir un hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire sur des oligosaccharides de formule :



5 dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄ et R₅, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₆, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium, ou un mélange de ceux-ci et isole les oligosaccharides ou leurs mélanges.

10 7 - Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que l'on effectue la réaction en milieu aqueux, à une température de 40 à 80°C et à un pH de 10 à 13.

8 - Procédé selon l'une des revendications 6 ou 7 caractérisé en ce que l'on utilise une solution aqueuse de 1 à 5% d'hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire.

15 9 - Procédé selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisé en ce que la réaction s'effectue à une température de 60 à 70°C.

10 - Procédé selon l'une des revendications 6 à 9 caractérisé en ce que le pH réactionnel est de 11 à 12,5.

11 - Procédé selon des revendications 6 à 10 caractérisé en ce que l'hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire est la soude, la potasse, l'hydroxyde de
20 lithium, de césium ou l'hydroxyde de tétrabutylammonium.

12 - Compositions pharmaceutiques contenant en tant que principe actif au moins un oligosaccharide selon la revendication 1.

13 - Compositions pharmaceutiques contenant en tant que principe actif au moins un oligosaccharide selon l'une des revendications 1 à 5.

5 14 - Utilisation des oligosaccharides de formule (I) selon l'une des revendications 1 à 5 pour la préparation d'un médicament utile pour la prévention ou le traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de nitrite oxyde (NO).

10 15 - Utilisation des oligosaccharides de formule (I) selon la revendication 14 pour la préparation de médicaments utiles pour la prévention et le traitement des ischémies cérébrales, cardiaques ou vasculaires périphériques, d'ostéoarthrites, des traumatismes du système nerveux central, des traumatismes crâniens, spinaux et cranio-spinaux, de la sclérose en plaques, des douleurs neuropathiques et des neuropathies périphériques, des maladies du motoneurone, de la sclérose latérale amyotrophique, du neuro-sida,
15 de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson et de la Chorée de Huntington.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 00/02897

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07H19/01 C08B37/00 A61K31/70 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P19/02 A61P9/10 A61P31/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07H C08B A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 084 999 A (CHOAY SA) 3 August 1983 (1983-08-03) cited in the application claim 1 figures 20,26,30	1,6, 12-14
A	ICHIKAWA Y. ET AL.: "Synthesis, from cellobiose, of a trisaccharide closely related to the GlcNAc->GlcA->GlcN segment of the anti-thrombin-binding sequence of heparin" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 141, 1985, pages 273-282, XP002142682 cited in the application page 273 page 275 * page 276, composés 13 et 14 * --- -/--	1,6, 12-14
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*G* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">14 June 2001</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">22/06/2001</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center;">Held, P</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02897

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WESSEL H. P.: "Sulfated 1,6-anhydro-4-O-(beta-D-glucopyranosyluron ate)-beta-D-glucopyranosyl derivatives: syntheses and conformations" J. CARBOHYDRATE CHEMISTRY, vol. 11, no. 8, 1992, pages 1039-1052, XP000929166 cited in the application page 1039 -page 1040, paragraph 1 page 1042</p> <p>-----</p>	<p>1,6, 12-14</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. l. No.

PCT/FR 00/02897

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0084999 A	03-08-1983	FR 2519987 A	22-07-1983
		FR 2520744 A	05-08-1983
		FR 2521566 A	19-08-1983
		FR 2527614 A	02-12-1983
		FR 2528853 A	23-12-1983
		FR 2528854 A	23-12-1983
		FR 2529557 A	06-01-1984
		FR 2531436 A	10-02-1984
		FR 2533219 A	23-03-1984
		FR 2533220 A	23-03-1984
		FR 2535306 A	04-05-1984
		AT 42956 T	15-05-1989
		AT 33496 T	15-04-1988
		AU 563351 B	09-07-1987
		AU 1039783 A	21-07-1983
		CA 1247608 A	27-12-1988
		CA 1265132 A	30-01-1990
		DE 3279684 D	15-06-1989
		DE 3376265 D	19-05-1988
		DK 14383 A	16-07-1983
		EP 0082793 A	29-06-1983
		ES 519232 D	16-03-1984
		ES 8402844 A	16-05-1984
		IE 54472 B	25-10-1989
		JP 1849958 C	21-06-1994
		JP 58170797 A	07-10-1983
		JP 5065517 B	17-09-1993
		JP 2510454 B	26-06-1996
		JP 5331182 A	14-12-1993
		US 4818816 A	04-04-1989
		US 4987223 A	22-01-1991
		US 4801583 A	31-01-1989
		SU 1694065 A	23-11-1991
		BE 898096 A	15-02-1984
		ES 279901 U	16-11-1984
		IT 1175140 B	01-07-1987

RAPPORT RECHERCHE INTERNATIONALE

Donnée internationale No

PCT/FR 00/02897

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07H19/01 C08B37/00 A61K31/70 A61P25/02 A61P25/14
A61P25/16 A61P25/28 A61P19/02 A61P9/10 A61P31/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07H C08B A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 084 999 A (CHOAY SA) 3 août 1983 (1983-08-03) cité dans la demande revendication 1 figures 20,26,30	1,6, 12-14
A	ICHIKAWA Y. ET AL.: "Synthesis, from cellobiose, of a trisaccharide closely related to the GlcNAc->GlcA->GlcN segment of the anti-thrombin-binding sequence of heparin" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 141, 1985, pages 273-282, XP002142682 cité dans la demande page 273 page 275 * page 276, composés 13 et 14 *	1,6, 12-14

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 juin 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/06/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Held, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: Je International No
PCT/FR 00/02897

C.(s) (s) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WESSEL H. P.: "Sulfated 1,6-anhydro-4-O-(beta-D-glucopyranosyluron ate)-beta-D-glucopyranosyl derivatives: syntheses and conformations" J. CARBOHYDRATE CHEMISTRY, vol. 11, no. 8, 1992, pages 1039-1052, XP000929166 cité dans la demande page 1039 -page 1040, alinéa 1 page 1042</p> <p>-----</p>	<p>1,6, 12-14</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De la Recherche Internationale No

PCT/FR 00/02897

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0084999 A	03-08-1983	FR 2519987 A	22-07-1983
		FR 2520744 A	05-08-1983
		FR 2521566 A	19-08-1983
		FR 2527614 A	02-12-1983
		FR 2528853 A	23-12-1983
		FR 2528854 A	23-12-1983
		FR 2529557 A	06-01-1984
		FR 2531436 A	10-02-1984
		FR 2533219 A	23-03-1984
		FR 2533220 A	23-03-1984
		FR 2535306 A	04-05-1984
		AT 42956 T	15-05-1989
		AT 33496 T	15-04-1988
		AU 563351 B	09-07-1987
		AU 1039783 A	21-07-1983
		CA 1247608 A	27-12-1988
		CA 1265132 A	30-01-1990
		DE 3279684 D	15-06-1989
		DE 3376265 D	19-05-1988
		DK 14383 A	16-07-1983
		EP 0082793 A	29-06-1983
		ES 519232 D	16-03-1984
		ES 8402844 A	16-05-1984
		IE 54472 B	25-10-1989
		JP 1849958 C	21-06-1994
		JP 58170797 A	07-10-1983
		JP 5065517 B	17-09-1993
		JP 2510454 B	26-06-1996
		JP 5331182 A	14-12-1993
		US 4818816 A	04-04-1989
		US 4987223 A	22-01-1991
		US 4801583 A	31-01-1989
		SU 1694065 A	23-11-1991
		BE 898096 A	15-02-1984
		ES 279901 U	16-11-1984
		IT 1175140 B	01-07-1987

THIS PAGE BLANK (USPTO)